Ch.mo Prof. Foà
omaggio

Laboratorio di patologia generale della R. Università di Sassari
diretto dal prof. Vincenzi

130

SULLA PRESENZA
del
VELENO TETANICO NEL SANGUE

Ricerche sperimentali

DEL

Dott. DOMENICO QUADU
(Assistente)

(Estratto dalla *Riforma Medica*, n. 241, ottobre 1894)

NAPOLI
Tipografia della Riforma Medica
Salita Pontecorvo, 60

1894

Laboratorio di patologia generale della R. Università di Sassari
diretto dal prof. Vincenzi

SULLA PRESENZA
del
VELENO TETANICO NEL SANGUE

Ricerche sperimentali

DEL

Dott. DOMENICO QUADU
(Assistente)

(Estratto dalla *Riforma Medica*, n. 241, ottobre 1894)

NAPOLI
Tipografia della Riforma Medica
Salita Pontecorvo, 60

1894

Kitasato (1) sperimentando con filtrati tetanici stabilisce che il veleno specifico passa nel circolo sanguigno e vi spiega la sua azione tossica.

Behring (2) dà importanza alla presenza della tossina nel sangue dei tetanici, sebbene ricordi che in due casi tipici e non leggeri di tetano il sangue si mostrò senza azione. Crede di aver trovato un rapporto, fino ad un certo grado, fra la gravezza della malattia e l'azione tetanizzante del sangue.

Vincenzi (3), salassando in modi diversi e in differenti periodi cavie, che avevano ricevuto sotto cute una dose mortale di filtrato tetanico, non riesce mai a salvarle, solo giunge in alcuni casi a ritardare l' esito finale.

---

(1) *Zeit. f. Hygiene*, XB, H. 2, S. 277.

(2) Die Blutserumtherapie, 1892.

(3) Comunicazione al V Congresso di medicina interna, 1892.

Cercando la tossina nel sangue, ha risultato negativo nei casi, nei quali si era limitato ad introdurre sotto cute la dose indispensabile a dare alle cavie un tetano acuto; positiva quando la dose era in eccesso.

Il modo di decorrere del tetano negli animali ha tanti e tali punti di somiglianza col quadro clinico del tetano nell' uomo, che molti dei risultati della patologia sperimentale possono certo essere utilizzati per la patologia umana.

Svelare la presenza del veleno tetanico nel sangue, qualora la gravezza della malattia fosse in rapporto diretto alla dose di tossina in esso contenuta, sarebbe fatto non solo di sommo interesse per la prognosi, ma di inestimabile valore pei criterî da seguirsi nella sieroterapia.

I risultati positivi di Nissen, Stern, Bruschettini, Kitasato, Behring, ecc., e quelli negativi di Kallmeyer, Stern, Behring ed altri, hanno una importanza relativa. Difatti le esperienze vennero fatte nei topi o nei conigli, mentre per la maggiore sensibilità delle cavie al veleno del tetano, su queste di preferenza dovevansi eseguire le inoculazioni. La quantità del sangue o del siero iniettato variò fra dosi minime e dosi estremamente grandi. Il sangue venne talora estratto mentre i fenomeni tetanici erano gravissimi ; tal' altra nel periodo agonico ; in molti casi poi a distanza maggiore o minore dalla morte avvenuta.

E' naturale che lo studio delle proprietà tetanigene del sangue nei malati di tetano,

per essere proficuo deve essere condotto in modo ben diverso da quello seguito finora.

Non solo dal lato clinico, mi sembra, che la constatazione o meno della tossina del tetano nel sangue per ora mal si presti a stabilire conchiusioni positive, certe (ad es., per la gravezza dei casi), ma anche i risultati contradittori ottenuti nel campo sperimentale meritano di essere sottoposti a nuove ricerche.

Dietro consiglio del prof. Vincenzi, prendendo le mosse da esperimenti riferiti nella comunicazione su citata, ho eseguito una serie di ricerche, delle quali do qui i principali risultati.

—

Le colture venivano fatte in brodo, e di preferenza sotto gas illuminante. Si lasciavano nel termostato a 36° Celsius, e le si toglievano appena cessava o diminuiva lo sviluppo di bollicine di gas. Ciò verificavasi generalmente fra il 5° e 8° giorno. Si passavano al filtro Kitasato, ed il liquido ottenuto si distribuiva in provette sterilizzate le quali venivano tenute all'oscuro, e in ghiaccio. Le diluzioni al decimo, centesimo, ecc., si preparavano al momento di sperimentare.

Queste norme sono indispensabili quando si voglia mantenere il grado di tossicità dei filtrati. Osservo però che il veleno tetanico lontano dalla luce, ed a temperatura di 0°, si altera talora notevolmente e in breve tempo, sicchè, stabilita la dose di filtrato sufficiente ad uccidere, ad es., una cavia di 600 grm., non possiamo, senza controlli, affer-

mare che nei giorni successivi la dose mortale sia sempre la stessa.

Nelle esperienze mi sono valso esclusivamente di cavie. Ho cercato innanzi tutto di stabilire quale fosse la quantità di filtrato indispensabile ad uccidere una cavia del peso di circa 600 grm., inoculandola sotto cute ad uno degli arti posteriori.

A seconda delle colture la dose oscillò fra 0,003 e 0,005. I fenomeni tetanici comparivano nelle 24 ore; mantenendosi sempre unilaterali guadagnavano il treno anteriore, e gli animali in gravissimo pleurostotono morivano di regola in quarta giornata.

Per studiare se il veleno tetanico passasse nel sangue, uccidevo le cavie a diversa distanza dal momento dell' inoculazione. Recisi i vasi al collo, raccoglievo tutto il sangue in una provetta sterilizzata, che si portava subito all'oscuro e dentro una vaschetta contenente ghiaccio. Separatosi il siero (3-12 ore) si inoculava sotto cute a cavie del peso di 200 a 300 grm. Talora ho iniettato il sangue appena estratto, però questo metodo ha molti inconvenienti. Una cavia di 600 grm. dà almeno 20 c.c. di sangue, una quantità quindi enorme per un' iniezione sottocutanea a cavie di piccola mole. Aggiungi che spesso avviene la coagulazione a metà dell'esperienza.

Il fatto che il veleno tetanico contenuto nel sangue passa completamente nel siero, basta per sè a raccomandare il metodo da me adoperato, per svelare anche minime tracce di tossina.

Nelle esperienze fatte non ho mai ottenuto

neanco fenomeni tetanici localizzati. Ora, quando si pensi che stabilita in 0,003 la dose mortale per una cavia di 600 grm., si ottengono fenomeni limitati, ma ben evidenti con 0,001; di più che le cavie inoculate con il siero non sorpassavano mai il peso di 300 grm., e quindi per avere un tetano locale abbisognavano di una dose ben minima, credo di poter concludere « che nel sangue delle cavie inoculate ad uno degli arti posteriori con la quantità indispensabile per ottenere la morte di tetano, non si riscontra tossina ».

—

In una seconda serie di esperienze ho studiato quale fosse la dose di veleno tetanico necessaria ad uccidere le cavie, introducendo il filtrato direttamente nel circolo sanguigno. L'iniezione si faceva nella vena giugulare.

Se la tossina del tetano per agire deve nelle iniezioni sottocutanee venire prima trasportata nel torrente circolatorio, sembrerebbe naturale che nell'iniezione diretta nel sangue i fenomeni tetanici dovessero comparire più presto.

Ho cominciato dall'iniettare la quantità mortale sottocutanea. Le cavie operate non presentarono la minima traccia di fenomeni tetanici. Allora ho ricorso a dosi maggiori, e sono riuscito ad ottenere la morte degli animali con tetano generalizzato, iniettando nella giugulare non meno di 6 volte la dose constatata mortale in cavie operate con lo stesso filtrato all'arto posteriore destro.

Le cavie che avevanò ricevuto nel sangue una così notevole quantità di tossina, presen-

tavano i primi fenomeni tetanici contemporaneamente o poco prima all' insorgenza del tetano negli animali inoculati sotto cute. Però mentre in questi i fenomeni si estendevano gradatamente, e solo in 4ª giornata si verificava la morte, nelle cavie operate nella giugulare, dall'inizio del tetano all'esito finale non passavano che poche ore (6-10). Difatti l'animale non aveva mostrato che una certa lentezza nel camminare o nel correre, quando ad un tratto si faceva rigido, fisso sulle gambe anteriori, teneva divaricate ed estese le posteriori, e respirava affannosamente, mantenendo la testa sollevata. Eccitato ad es. con un colpo dato sul tavolo, tutto di un pezzo scattava per ricadere nella posizione primitiva. Talora muovendo le zampe posteriori (movimento di nuoto) riusciva a camminare, cadeva però facilmente di fianco. Col trisma, che in questi casi non mancò mai, i fenomeni andavano rapidamente aggravandosi, e l'animale moriva.

Togliendo il sangue alle cavie così operate, si riuscì costantemente col siero a riprodurre il tetano in altre cavie, inoculandole sotto cute. E questo risultato si ebbe sia togliendo una certa quantità di sangue pochi minuti dopo l'iniezione fatta, o nel periodo del tetano generalizzato, o dopo morte.

Noto che l' iniezione nella giugulare, operazione delicata per sè stessa, diventa delicatissima nel caso nostro. La quantità di liquido inoculata fu sempre piccola, e variò fra $^{1}/_{20}$ di cc. a $^{2}/_{10}$. Per essere matematicamente sicuri che il liquido è penetrato nel

circolo, conviene avvertire il rigurgito del sangue al momento dell'infissione dell' ago nella vena. Non risalendo il sangue nella cannula, può benissimo, senza che noi ce ne accorgiamo, infiltrarsi il liquido nella guaina vascolare, oppure diffondersi nei tessuti circostanti. In questi casi il modo di presentarsi e di decorrere dei sintomi tetanici, ci avverte che l'iniezione fu male eseguita. Difatti l'animale si presenta rigido al collo, lo tiene curvo con la concavità rivolta verso il lato operato; poi si fa rigido nel treno anteriore tenendo dritte e addotte le estremità. I fenomeni tetanici man mano si estendono dai muscoli toracici agli addominali, e il ventre si presenta espanso, duro. La motilità degli arti posteriori non si altera notevolmente, cosicchè l'animale riesce a cambiare di posizione, muovendosi in modo assai curioso e caratteristico. Fra l'inizio dei sintomi tetanici e la morte decorre un tempo di gran lunga superiore a quello che si osserva nei casi di iniezione endo-vascolare. Qualche rara volta non si osserva la curvatura del collo, però sono sempre ben distinti gli altri sintomi su descritti. Aggiungiamo che la dose necessaria a produrre il tetano mortale coll'iniezione sottocutanea al collo, oppure per esperienza mal riuscita, coll'infiltrazione del veleno tetanico nei tessuti vicini alla giugulare, corrisponde su per giù a quella adoperata nelle inoculazioni ad una delle estremità posteriori. Di regola però è un poco superiore, e i fenomeni tetanici compaiono con qualche ritardo.

Dalle esperienze fatte nell'intento di studiare il modo d'agire del veleno tetanico iniettato direttamente nel sangue, mi risultò dunque che « la dose mortale per le cavie è per lo meno sestupla della quantità necessaria ad ucciderla per via sottocutanea ».

Il fatto che l'iniezione della tossina nella giugulare conduce ad un tetano generale e di corta durata, potrebbe far sorgere il dubbio che la maggior dose di veleno, adoperata in confronto a quella delle iniezioni sottocutanee, stesse in diretto rapporto allo sviluppo tumultuario, esteso, dei fenomeni tetanici. Se nelle inoculazioni fatte in una delle estremità, possiamo ottenere a seconda della quantità di veleno adoperato o un tetano limitato ad un gruppo di muscoli, o il tetano unilaterale, o infine il tetano generale, noi vediamo nel caso di diretta iniezione nel sangue che, o non si hanno manifestazioni di malattia almeno apprezzabili, o il tetano si generalizza e uccide in breve tempo. Ammessa l'opinione del Kitasato, come potremmo spiegare che un veleno, il quale ha bisogno, per agire, di passare nel sangue, è mortale con dosi minime nelle inoculazioni sottocutanee, e solo con dosi notevolissime lo diventa, portato direttamente nel circolo?

Ho pensato che la soluzione di continuo prodotta coll'ago della siringa potesse in qualche modo aver valore nell' insorgenza e localizzazione dei fenomeni provocati da un veleno così misterioso e tanto potente. E allora, sebbene le esperienze fatte coll'iniezione nella giugulare parlassero chiaramente

contro questo mio dubbio, ho voluto vedere come si comportassero le cavie, alle quali iniettavo nel sangue una certa dose di veleno, e poi producevo, sia coll'ago di una siringa, sia con un bistori, delle soluzioni di continuità, ad es. in una zampa. Eccone il risultato:

Nei casi nei quali la dose era insufficiente a procurare il tetano generale, non ho mai veduto traccia di contratture nel territorio muscolare in vicinanza alla lesione fatta. Nei casi poi di inoculazione della dose mortale, i fenomeni decorrevano in modo identico a quelli presentati da una cavia senza precedente operazione.

—

Per meglio apprezzare il valore che può avere la presenza del veleno tetanico nel sangue, ho creduto bene di studiare come si comportassero le cavie alle quali contemporaneamente inoculavo sotto cute una certa dose di tossina ed un' altra nella giugulare.

Dato che la dose mortale sottocutanea fosse ad es. di 0,003, mi limitavo ad iniettare nella zampa posteriore destra 0,001 e nel sangue 0,001, o quantità progressivamente maggiori.

Constatai che i fenomeni tetanici localizzati, dovuti all' iniezione sotto cute, non si aggravarono nè punto nè poco anche quando la dose inoculata nella giugulare superava da sè la mortale sottocutanea. Gli animali cioè si comportavano in modo identico a quelli esclusivamente inoculati nello stesso tempo e con lo stesso filtrato alla zampa.

Ho provato di iniettare nel sangue il ve-

leno tetanico quando già le cavie prima operate sotto cute, avevano dei fenomeni di tetano parziale stazionario. Anche in questi casi la tossina portata nel sangue non aggravò menomamente la malattia.

Questi risultati dimostrano bene come il modo di diffondersi della tossina elaborata dal bacillo di Nicolaier deve essere assai diverso da quello stabilito da Kitasato.

Scrissi più sopra che il fatto della generalizzazione del tetano nelle iniezioni endovascolari potrebbe far credere ad un rapporto diretto fra il modo di decorrere della malattia e la dose adoperata per procurarla. Ciò non è assolutamente.

Se per dare il tetano ad una cavia con la inoculazione della tossina nella giugulare è indispensabile almeno una dose sestupla della mortale sottocutanea, riesce facile a persuadersi, che buona parte del veleno rimane a circolare col sangue, senza disperdersi fino alla morte dell'animale.

Togliendo del sangue ad intervalli diversi dal momento dell'inoculazione, noi troviamo pressocchè uguale la quantità di veleno contenuta, ad es., in un centimetro cubico. I fenomeni si aggravano, l' animale è agonico, pur nel suo sangue circola la tossina inalterata, non trovando cioè modo di passare nei tessuti, nè facile via di eliminazione.

Sarebbe utile di conoscere quale sia la quantità del veleno tetanico che scompare dal sangue, non fosse altro, per stabilire in quale rapporto si trovi con la dose mortale sottocutanea. Ma di questo quesito, come di

molti altri che si collegano strettamente con l' argomento, mi occuperò in un lavoro successivo.

Richiamo l' attenzione del lettore sul fatto che, mentre il veleno tetanico inoculato sotto cute, può dar la morte delle cavie, senza che nel sangue si riesca a constatarne neanche la più piccola traccia, nelle iniezioni endovascolari il tetano generale si ottiene conservandosi nel sangue buona parte della tossina adoperata, sino alla morte dell'animale.

E qui rispondo alla domanda che viene subito suggerita dai fatti enunciati a proposito dell'iniezione della tossina nel sangue: il veleno tetanico si elimina pel rene?

Per esperienze mie e per molte altre eseguite in laboratorio nell' intento di studiare l'importanza della funzione renale nell'intossicazione tetanica, posso con sicurezza dire che il rene mal si presta a lasciar passare la tossina del tetano. Azzardo altresì di aggiungere che ciò deve stare in rapporto alla natura chimica del veleno. Con questo non intendo escludere che le orine possano divenire tetanigene; ma qualora lo sieno, più che alla quantità della tossina circolante, l'eliminazione si deve a condizioni speciali del rene.

Ho ricordato come con le inoculazioni sottocutanee ad uno degli arti posteriori noi riusciamo ad ottenere, a seconda della dose di tossina usata, o un tetano locale, o unilaterale, o generalizzato. Quando i fenomeni tetanici, pur rimanendo di prevalenza in una metà del corpo, si estendono all'altra e in un periodo vicino alla insorgenza dei primi sin-

tomi (fatto che si ottiene solo con forti dosi di veleno) raccogliendo il sangue con la recisione dei vasi al collo, riscontriamo costantemente con l'iniezione del siero in cavie di piccola mole, che in esso è contenuta una certa quantità di tossina. Il tetano decorre allora in uno spazio di tempo più breve assai di quello che intercede fra il momento dell'inoculazione sottocutanea della dose esclusivamente letale e la morte della cavia. Mentre in questo caso occorrono quattro giorni, nell'altro dalle 24 alle 36 ore. Più breve si presenta poi l'intervallo fra l'inoculazione e la comparsa dei fenomeni tetanici. Facendo dei confronti sul modo di decorrere del tetano in animali operati sotto cute con una dose almeno sestupla della mortale, e cavie inoculate nella giugulare con la medesima pose, troviamo che in queste i fenomeni compaiono più tardi, ma la morte avviene prima.

Sarebbe importante di conoscere in quale rapporto stia la quantità di tossina necessaria per via sottocutanea a dare un tetano generale, con quella che, nelle cavie operate nella giugulare, scompare dal sangue. In questo studio non si tratta semplicemente di precisare la dose capace di dare il tetano generale iniettata ad es. ad un arto posteriore, ma naturalmente si estende a saper dedurre da essa la quantità di tossina passata nel sangue.

Mi preme qui di far notare che la presenza del veleno tetanico nel circolo, nei casi nei quali noi stessi l'abbiamo portato direttamente nel sangue, ha un significato ben diverso che in quelli, dove invece si tratta di assor-

bimento del filtrato inoculato sotto cute. Difatti nelle iniezioni endovascolari, per prodursi il tetano è indispensabile che la tossina circolante sia in grande quantità; nelle iniezioni sotto-cute invece il veleno tetanico passa nel sangue, e in quantità progressivamente maggiore, solo quando moltiplichiamo la dose mortale sottocutanea.

E' ben vero che la quantità di veleno che abbandona il circolo nelle iniezioni nella giugulare è certo piccola in confronto a quella che vi rimane, ma la tossina se non si trova sospesa in dose notevole nel sangue, non produce tetano.

—

Behring nei casi da curarsi col siero di animali immuni, domanda venga estratta una quantità di sangue nell' intento di studiare sperimentalmente se contenga o meno tossina.

Sarà importante di conoscere il risultato di tali ricerche, non solo per vedere se vi sia un rapporto costante fra la presenza del veleno tetanico nel sangue e la maggiore gravezza dei casi, ma per conoscere altresì se vi sia accordo coi fatti sperimentali da noi enunciati.

Per quanto il quadro clinico del tetano nella cavia non riproduca perfettamente quello che si osserva nell'uomo, è certo che l'azione del veleno si svolge in modo simile.

Lasciamo in disparte le nostre ricerche fatte nell'intento di conoscere l'azione della tossina del tetano direttamente iniettata in circolo, ricerche le quali dimostrano, nel modo più assoluto, assurda l' opinione di Kitasa-

to, e teniamoci a quelle che hanno riscontro nella patologia umana. Le iniezioni sottocutanee che riproducono le condizioni nelle quali il tetano si svolge nell'uomo, provano senza discussione « che la mancanza del veleno tetanico nel sangue si osserva anche nei casi mortali ».

D'altra parte sta il fatto che nelle inoculazioni di quantità enormi di tossina il sangue diviene tetanigeno; ma quale valore assoluto può avere la constatazione della tossina nel sangue, se l'esito è infausto quando essa manca?

Valga pure a denotare la gravezza notevole del caso, perchè la produzione di tossina è in eccesso, certo non potrà essere però elevato a criterio differenziale per pronunziare una prognosi fausta in caso contrario.

Ma vi ha di più; da esperienze del prof. Vincenzi, alle quali fanno riscontro alcuni fatti raccolti nel campo clinico, il sangue può divenire tetanigeno quando i fenomeni tetanici gravissimi si fanno stazionarî, e il veleno trova modo di essere eliminato dai reni. In questi casi il significato che acquista la presenza della tossina e nel sangue e nelle urine, è certo ben diversa da quello che pretenderebbe di dare il Behring.

Si è per questo che, accennando al modo di studiare sperimentalmente il sangue dei tetanici, dicevo che i risultati finora ottenuti hanno un valore molto relativo. Per trarre delle conseguenze utili conviene tener conto non solo della quantità di siero inoculata, del peso dell'animale, ecc., ma altresì del tempo

nel quale si tolse il sangue, vale a dire in quale periodo della malattia, nè dimenticare di sperimentare prima con le urine.

Nello studio del tetano si sono già ottenuti dei risultati davvero splendidi, ma i problemi da risolversi sono ancora numerosi, e ciò che più interessa è ancora un' enigma « la natura chimica del veleno tetanico, e il modo d'agire sull'organismo.



VERIFICATO